

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.  
10. Jg. 1972, S. 569—572

## Richtigkeit und Präzision bei verschiedenen Methoden zum Nachweis von Fructose im Sperma

Von G. PETER und V. HAUENSTEIN

*Aus der Biochemischen Abteilung (Leiter: Priv. Doz. Dr. G. Peter) der Dermatologischen Universitätsklinik  
Würzburg*

(Eingegangen am 28. Juni/28. August 1972)

Getestet wurden die Reaktionen der Fructose mit Anthron, Anthron + Thioharnstoff, Diphenylamin, Resorcin und die enzymatische Methode. Über die Bestimmung der Richtigkeit und Präzision mit den genannten Methoden beim Fructose-Nachweis im Sperma wird berichtet. Die statistische Analyse ergab, daß die beiden Anthron-Reagenzien für den Fructose-Nachweis wegen der zu großen Abweichung der Mittelwerte vom Sollwert ( $\pm 25\%$ ) nicht zu empfehlen sind. Die Regressions- und Varianzanalyse ergaben, daß die Diphenylamin-, Resorcin- und enzymatische Methode einander ebenbürtig und gleich gut sind. Die Problematik und Aussagekraft der einzelnen Verfahren wird diskutiert.

### *The accuracy and precision of different methods for the determination of fructose in spermatazoa*

Fructose was determined by reaction with anthrone, anthrone + thiourea, diphenylamine, or resorcinol, and by the enzymic method. The accuracy and precision of these methods are reported for the determination of fructose in spermatazoa. Statistical analysis showed that both the anthrone reagents are unsuitable for the determination of fructose, since they gave average values which varied from the theoretical by  $\pm 25\%$ . Regression and variance analyses showed that the diphenylamine, the resorcinol and the enzymic methods are all equally suitable. The associated problems and the diagnostic value of each method are discussed.

Bei andrologischen Untersuchungen wird der Fructose-Bestimmung bekanntlich eine große Bedeutung beigemessen (1). Einige von den in der Literatur (2) beschriebenen Verfahren werden in überwiegendem Maße auf breiter Ebene angewandt. Es bestehen aber recht unterschiedliche Meinungen über die Genauigkeit der einzelnen Methoden.

Wir haben daher den Versuch unternommen, die gängigsten Methoden auf ihren Aussagewert hin zu überprüfen. Im einzelnen wurde die Reaktion der Fructose mit Anthron (3), Anthron + Thioharnstoff (4), Diphenylamin (5), Resorcin (6) und die enzymatische Methode (7) getestet.

Diese vorwiegend für den Fructose-Nachweis in Harn und Blut benutzten Verfahren wurden für die Sperma-Matrix teilweise modifiziert.

### Material und Methoden

#### Sperma

Es wurde jeweils frisch gewonnenes Ejakulat von etwa 100 Versuchspersonen verwendet und sofort für die Analyse eingesetzt.

#### Standard-Fructoselösung

Die Konzentration der Stammlösung betrug 200 mg/100 ml und wurde für die Aufstellung von Eichkurven entsprechend verdünnt.

#### Chemische Fructose-Bestimmung

##### *Verfahren 1 (Diphenylamin)*

0,1 ml Probe wurde mit 8 ml  $\text{CdSO}_4$  (13 g  $\text{CdSO}_4$  + 63,5 ml 0,5 mol/l  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ad 1000 ml) gemischt, 1 ml 1 mol/l NaOH zugesetzt, gemischt, 10 min zentrifugiert (3000 U/min) und durch ein Faltenfilter filtriert. 4 ml Filtrat wurden mit 2 ml HCl ( $d = 1,19$ ) und 0,4 ml Diphenylaminlösung (10 g Diphenylamin in 100 ml abs.

Äthanol) gemischt, die Reagenzgläser locker verschlossen, 15 min in siedendem Wasserbad erhitzt, 3 min unter fließendem Wasser gekühlt, 4 ml *n*-Propanol zugesetzt, 20 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und bei 620 nm die Extinktion bei 0,5 cm Schichtdicke gegen Wasser bestimmt. Der aus der Eichkurve abgelesene Wert wurde mit dem Faktor 91 multipliziert. Angabe in  $\mu\text{g/ml}$  Sperma.

##### *Verfahren 2 (Resorcin)*

0,1 ml Probe wurde mit 0,3 ml dest. Wasser gemischt, 2 ml 10proz.  $\text{ZnSO}_4$ -Lösung und 2 ml 0,1 mol/l NaOH zugegeben, 2 min in siedendem Wasserbad erhitzt, abgekühlt und durch ein Faltenfilter filtriert. 2 ml des klaren Filtrats wurden mit 2 ml Resorcinlösung (0,1% in 96% Äthanol) und 6 ml 30proz. HCl versetzt, 8 min in einem Wasserbad von 80°C erhitzt, abgekühlt und die Extinktion bei 490 nm (1 cm Schichtdicke) abgelesen. Der aus der Eichkurve abgelesene Wert wurde mit 44 multipliziert. Angabe in  $\mu\text{g/ml}$  Sperma. Variante (ohne Verwendung einer Eichkurve): Berechnung erfolgte nach  $\frac{E_{\text{Probe}}}{E_{\text{Standard}}} \cdot 2000$ .

##### *Verfahren 3 (Anthon)*

0,1 ml Sperma wurde mit 4,9 ml 3proz.  $\text{HClO}_4$  enteiweißt und filtriert. 1 ml des Filtrats wurde mit 2 ml Anthronlösung (0,2% in 96proz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) im Eisbad versetzt, weitere 30 min gekühlt und anschließend bei 620 nm die Extinktion bei 0,5 cm Schichtdicke abgelesen. Das Extinktionsverhältnis von Probe: Standard multipliziert mit 2000 ergibt die Konzentration in  $\mu\text{g/ml}$  Sperma.

##### *Verfahren 4 (Anthon + Trisharnstoff)*

0,5 ml Sperma wurde mit 4,5 ml 3proz.  $\text{HClO}_4$  enteiweißt und filtriert. 1 ml des Filtrats wurde mit 10 ml Anthronreagenz (500 mg Anthron + 10 g Thioharnstoff in 1000 ml 66proz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  bei 80–90°C lösen) versetzt, 30 min stehen gelassen und die Extinktion gegen Wasser bei 1 cm Schichtdicke abgelesen. Der aus der Eichkurve erhaltene Wert muß mit 10 multipliziert werden. Angabe in  $\mu\text{g/ml}$  Sperma.

Tab. 1

Präzision und Richtigkeit von Standard-Fructose-Kontrollproben. Mittelwert aus je 10 Analysen. Sollwert: 2000 µg/ml

	Anthron	Anthron + Thioharnstoff	Resorcin	Diphenylamin	enzymatische Methode
$\bar{x}$ (µg/ml)	2496	2260	2037	1966	2037
Mittl. Abweichung des $\bar{x}$ vom Sollwert in %	+24,8	+13	+1,9	±4,0	+1,9
Standardabweichung (µg/ml)	±148	±37	±43	±88	±54
Variationskoeffizient V (%)	5,92	1,63	2,11	4,5	2,65
Zulässige Streubreite $\bar{x} \pm 2s$	2200—2792	2186—2334	1951—2123	1790—2142	1929—2145

### Enzymatische Fructose-Bestimmung

Hierfür wurde das von BERNT und BERGMAYER (7) ausgearbeitete Verfahren benutzt. Für die Filtration nach Enteiweißung wurden Kieselgur-Filter verwendet.

### Ergebnisse

#### Richtigkeit und Präzision von Standard-Kontrollproben

Zunächst wurde die zu erzielende Bestimmungsgenauigkeit der einzelnen Verfahren an einer Reihe von Fructose-Standardlösungen mit einem Sollwert von 2000 µg/ml untersucht.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 aufgeführt und lassen erkennen, daß die schlechtesten Resultate mit dem Anthron- bzw. Anthron + Thioharnstoff-Nachweisreagenz erzielt wurden. Die übrigen 3 Verfahren sind hinsichtlich Präzision und Richtigkeit als gut zu bezeichnen. Als *Richtigkeit* (Kenngröße für systematische Fehler) wurde die Abweichung des Mittelwertes ( $\bar{x}$ ) vom Sollwert der Kontrollprobe definiert.

Die *Präzision*, als Kenngröße für zufällige Fehler, wurde durch die Standard-Abweichung (s) ausgedrückt. Die relative Standardabweichung (= Variationskoeffizient) wurde nach der allgemein bekannten Formel berechnet.

#### Regressions- und Varianz-Analyse

Aufgrund der vorangegangenen Untersuchungen konnten die beiden Anthron-Verfahren bei der statistischen Analyse der Sperma-Proben eliminiert werden.

#### Regressions-Analyse und Korrelationskoeffizient

Beim Vergleich der einzelnen Methoden miteinander resultierten die in Tabelle 2 aufgeführten Ergebnisse.

Tab. 2

Regressionsgeraden und Korrelationskoeffizienten für die durchgeführten Methoden-Vergleiche

Methode	Gl. der Regressionsgeraden	Korrelationskoeffizient
Diphenylamin/Resorcin	$y = 295 + 0,82 x$	$r = +0,98$
Diphenylamin/enzymatisch	$y = 0,94 x - 70,8$	$r = +1,00$
Resorcin/enzymatisch	$y = 1,09 x - 225,3$	$r = +0,97$

Aus Tabelle 2 und den Abbildungen 1—3 wird deutlich, daß eine lineare hochpositive Korrelation besteht, somit die genannten drei Verfahren praktisch vollständig übereinstimmen.

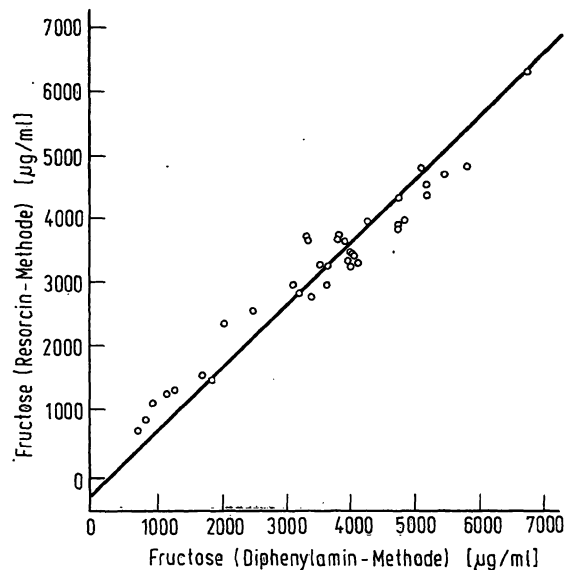


Abb. 1  
Regressionslinie bei Vergleich von Diphenylamin- und Resorcin-Methode

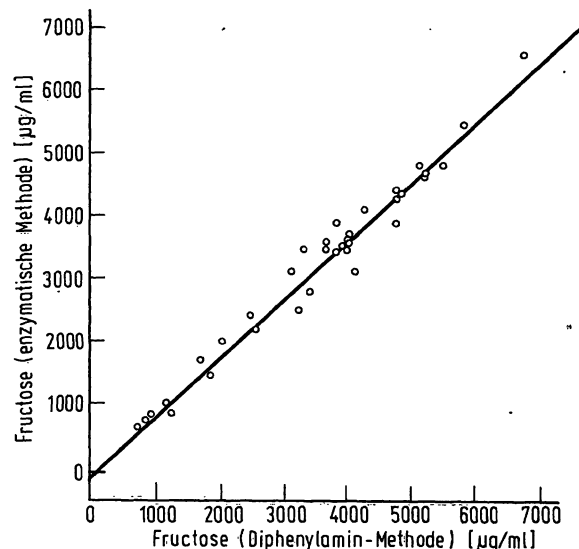


Abb. 2  
Regressionslinie bei Vergleich von Diphenylamin- und enzymatischer Methode

#### Varianzanalyse

Die Prüfung der Regressionslinien wurde mit Hilfe des F-Testes durchgeführt.

Zunächst bestimmten wir die Summe der Abweichungsquadrate insgesamt (SQ insgesamt) und dann die Varianz zwischen den Stichproben (SQ zwischen). Die gewonnenen Werte sind in Tabelle 3 eingetragen.

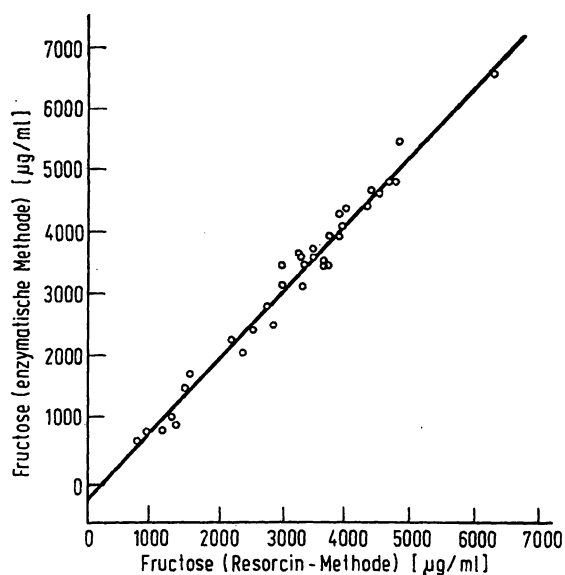


Abb. 3  
Regressionslinie bei Vergleich von Resorcin- und enzymatischer Methode

Tab. 3

Varianzanalytische Daten.  $SQ(ig)$ ,  $SQ(zw)$ ,  $SQ(in)$  = Summe der Abweichungsquadrate insgesamt, zwischen den und innerhalb der Stichproben;  $FG$  = Freiheitsgrad

	$SQ$	$FG$	$s^2 = \frac{SQ}{SG}$
Insgesamt (ig)	210036730	104	
Stichprobenfehler (zw)	2504491	2	1 252 245,5
Versuchsfehler (in)	207532239	102	2 034 629,8

Hieraus resultiert ein Q-Wert ( $Q = \frac{s^2(zw)}{s^2(in)}$ ) von 0,61.

Da dieser Wert wesentlich kleiner ist als der in den einschlägigen Tabellen, können die Abweichungen um die Regressionsgrade als zufällig angesehen werden. Die Regressionsgerade beschreibt also unser Zahlenmaterial ausreichend genau.

## Diskussion

Aus dem methodischen Teil ist unschwer zu erkennen, daß die beiden Anthron-Methoden den relativ geringsten Arbeitsaufwand benötigen. Diesem offensichtlichen Vorteil steht eine hohe Ungenauigkeit hinsichtlich Präzision und Richtigkeit der Ergebnisse gegenüber. Dies zeigt sich in deutlicher Weise bei der Konstruktion der Eichkurve. Eine einmal aufgestellte Eichkurve war in aufeinander folgenden Tagen mit dem gleichen Reagenz nicht mehr reproduzierbar, d. h. die Steigung der Geraden schwankte von Tag zu Tag. Zum gleichen Ergebnis gelangten wir in Langzeit-Versuchen, bei denen wir immer die gleiche Fructose-Konzentration vorlegten und etwa 6 Wochen lang die Extinktion registrierten.

Daraufhin veränderten wir die Reaktionstemperatur, da diese einen wesentlichen Parameter darstellt. Wir stellten fest, daß die Werte am schlechtesten sind, wenn man nach der Originalvorschrift, d. h. ohne Kühlung, vorgeht. Arbeitet man mit Eiskühlung, so erhält man

zwar etwas niedrigere Werte, die aber ebenfalls stark schwankten, d. h. zu hoch oder zu tief liegen, wie aus Tabelle 1 hervorgeht.

In diesem Zusammenhang wurde auch versucht, die Frage zu klären, bei welcher Temperatur (Raum- oder Kühlschrank-Temperatur von  $+4^\circ\text{C}$ ) das Anthron-reagenz aufbewahrt werden soll. Eindeutige Unterschiede konnten wir hierbei nicht erkennen.

Nach unseren Erfahrungen muß festgestellt werden, daß die mit den genannten Anthron-Reagenzien aufgestellten Eichkurven für eine exakte Auswertung nicht verwendet werden können.

Zur Diphenylamin-Methode ist festzustellen, daß die Eichkurve gut reproduzierbar ist. Eine signifikante Änderung der Extinktionswerte tritt innerhalb von 3 Tagen nicht ein. Methodisch wurde die eingesetzte Spermamenge abgeändert. Bei Verwendung von 1 ml Probe (statt 0,1 ml) werden die Extinktionen zu hoch. Dadurch ist eine exakte Ablesung nicht mehr gewährleistet.

Mit der Resorcin-Methode können nur dann gute und übereinstimmende Resultate erzielt werden, wenn das Nachweis-Reagenz täglich frisch hergestellt wird, denn mit zunehmendem Alter der Resorcinlösung flacht die Eichkurve ab. Wir konnten beobachten, daß z. B. für eine Konzentration von  $100 \mu\text{g/ml}$  schon nach 2 Tagen die Extinktion von ursprünglich 0,7–0,6 auf 0,35, also fast 50%, abfiel. In diesem Zusammenhang ist es völlig unverständlich, wie SCHIRREN (8) eine Tabelle angeben kann, in der Extinktionswerte entsprechenden Fructosewerten im Sperma zugeordnet werden.

Angesichts des oben genannten Sachverhalts ist eine derartige Empfehlung aufgrund der Streubreite, die nicht einmal angegeben wird, unzulässig. Außerdem ist der in l. c. (8) auf S. 24 angegebene Multiplikationsfaktor unrichtig. Er müßte, gemäß den Angaben, nicht 80, sondern 44 lauten, wie die Überprüfung ergeben hat. Der Faktor 80 hätte nur dann Gültigkeit, wenn die 0,1 ml Sperma-Probe auf 4,0 ml (nicht 0,4 ml) mit dest. Wasser aufgefüllt wird.

Nach unseren Erfahrungen sollte auch für diese Methode keine Eichkurve, sondern ein Standard verwendet werden. Der im methodischen Teil angegebene Faktor 2000 gilt nur, wenn die Konzentration des verwendeten Fructose-Standards  $2000 \mu\text{g/ml}$  beträgt.

Das benutzte enzymatische Verfahren kann kommentarlos empfohlen werden. Bei Verwendung hinreichend reiner Enzyme und Coenzyme ist eine exakte Bestimmung immer gewährleistet.

Abschließend sei die Rangfolge der benutzten Verfahren hinsichtlich Arbeitsaufwand angegeben:

Anthron	↓ zunehmender Aufwand
Anthron + Thioharnstoff	
enzymatische Methode	
Resorcin	
Diphenylamin	

In bezug auf Präzision und Richtigkeit ergibt sich folgende Reihenfolge:

enzymatische Analyse	}	einander ebenbürtig
Resorcin		
Diphenylamin		
Anthron + Thioharnstoff	}	einander ebenbürtig und gleich schlecht.
Anthron		

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß bei allen Methoden die Berechnung der Analysenergebnisse unter Einbeziehung eines Standards der Auswertung über eine Eichkurve vorzuziehen ist. Nur dadurch ist es möglich, irrelevante Faktoren weitestgehend auszuschließen.

### Literatur

1. MANN, TH. (1964), The biochemistry of semen and of the male reproductive tract, 1. Aufl., S. 237—265, Methuen & Co, Ltd., London and John Wiley & Sons, Inc., New York. — 2. HINSBERG, K. & LANG, K. (1957), Medizinische Chemie für den klinischen und theoretischen Gebrauch, 3. Aufl., S. 354—360, Urban & Schwarzenberg, München-Berlin-Wien. — 3. BONTING, S. L. (1954), Arch. Biochem. Biophys. 52, 272—279. — 4. ROE, J. H. (1955), J. Biol. Chem. 212, 335—343. — 5. MARTIN, R. W. (1939), Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 259, 62—74. — 6. ROE, J. H. (1934), J. Biol. Chem. 107, 15—22. — 7. BERNT, E. & BERGMAYER, H. U. (1970), Methoden der enzymatischen Analyse, Bd. 2, 2. Aufl., S. 1266—1269, Verlag Chemie Weinheim. — 8. SCHIRREN, C. (1971), Praktische Andrologie, 1. Aufl., S. 24—25, Verlag Brüder Hartmann, Berlin.

PD Dr. G. Peter  
 Biochem. Abteilung der Univ.-Hautklinik  
 8700 Würzburg  
 Josef-Schneider-Str. 2